中井泰男*: ゲル等電点焦点法によって得られたシダ類数種のエステラーゼの種間変異（予報）

Yasuo NAKAI*: Specific variation of the esterase obtained by the gel isoelectrofocusing method in some ferns

(Preliminary report)

植物の起源や類縁関係を探求する系統分類学は，形態的な変化をはじめとして生態的，生理的な差異にもとづいて分類がなされていた。また化学成分などによる分類は古くからいろいろやられているが（色素，精油，血清など）近ごろ蛋白質，酵素を分析してその比較研究を行なう“chemotaxonomy”が盛んになった。そこで著者は蛋白質や酵素を分離するための新らしい方法であるゲル等電点焦点法（Gel isoelectrofocusing method）ならびに従来のディスク電気泳動法を用いてシダ類の胞子，葉に含まれる酵素（エステラーゼ）分析をし，シダ類の類縁関係を検討しようと試みた。

材料および方法

この実験に用いた材料は表 1 に示すようにシダ植物 14 種類である。これらの種類は冬期から早春に採集したものであり胞子細胞において酵素活性が最も盛んであると考えられる減数分裂期の未熟胞子および胞子の付着している葉を用いた。試料の抽出はおもに未熟胞子および葉を約 300 mg とり，トリス・グリシン緩衝液 (pH 8.3) 0.3

表 1. エステラーゼ・アイソザイムの分析に用いたシダ類

番号	種類		使用部分	産地
(1)	スギナ	*Equisetum arvense*	胞子	亀岡市
(2)	ヒメムカゴシダ	*Monachosorum arakii*	胞子＋葉	和知町長老岳
(3)	ホラシノブ	*Sphenomeris chusana*	,,	伊豆，下田町
(4)	ハマホラシノブ	*S. biflora*	,,	,,
(5)	イノモトソウ	*Pteris multifida*	,,	亀岡市（道ばた）
(6)	オニイノデ	*Polystichum rigens*	,,	,, （山中）
(7)	ジュウモンジシダ	*P. tripteron*	,,	,,
(8)	ヤブソテツ	*Cyrtomium fortunei*	,,	,, （道ばた）
(9)	オクマワラビ	*Dryopteris uniformis*	,,	,,
(10)	クマワラビ	*D. lacera*	,,	,,
(11)	ベニシダ	*D. erythrosora*	,,	京大理植物園
(12)	コモチシダ	*Woodwardia orientalis*	,,	亀岡市（道ばた）
(13)	アオネカズラ	*Polypodium niponicum*	,,	,, （川ばた）
(14)	ヤノネシダ	*Neocheiropteris subhastata*	,,	,, （山中）

---

*京都大学農学部遺伝学教室. Laboratory of genetics, Faculty of Agriculture, Kyoto University.

～1.0 ml でホモゲナイズし 20,000 xg, −10°C で 20 分間冷却遠沈して抽出液を得た。この抽出液約 0.3 ml を次の方法で供試した。なお胞子の成熟程度とパターンの関係を比較するために成熟胞子，新芽をも用いた。

(1)　**電気泳動法** (図 1-1). 従来から行なわれている方法で分離ゲルの上に濃縮ゲル層を作りその上に 0.3 ml の抽出した試料を入れ泳動装置にとりつける。泳動液槽にはトリス・グリシン緩衝液を入れて定電流定電圧装置にとりつけ，カラム 1 本につき約 4 mA の定電流を流す。泳動に要する時間は 60 分前後である。通電後のゲルはカラムよりとり出して染色し，それぞれのバンドの Rf 値をもとめて比較検討した。

～電気泳動に必要な試薬～

1.　抽出溶液：トリス・グリシン (pH 8.3) ― トリスヒドロオキシメチルアミノメタン (Tris) 0.6%，グリシン 2.88%.

2.　電極槽用緩衝液：抽出に用いたトリス・グリシン緩衝液を陽極，陰極ともに用いる。

3.　分離用ゲル溶液：(A) 1 N HCl 48.0%，Tris 36.6%，N, N, N′, N′-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 0.2%，(pH 8.9).　(B) アクリルアミド 30%，N, N′-メチレンビスアクリルアミド (BIS) 0.8%.

(A) 1：(B) 2：水 1 を (a)，過硫酸アンモニューム 0.14% を (b) とすると，(a) 1：(b) 1 の混合比で使用する。

4.　濃縮用ゲル溶液：(C) 1 N HCl 48.0%，Tris 5.98%，TEMED 0.46%，(pH 6.7).　(D) アクリルアミド 10.0%，BIS 2.5%.　(E) リボフラビン 40 mg/l.

(C) 1：(D) 2：(E) 1：水 4.

5.　ゲル染色用溶液：Fast blue RR 塩 50 mg を Phosphate 緩衝液 40 cc に溶かしこの液中にゲルを 1～2 分間浸たして別に設けた α-Naphthyl acetate 15 mg をアセトン 15 cc に溶かした基質溶液をただちに入れて反応させる。

(F) Phosphate 緩衝液 (pH 7.0)―KH_2PO_4 0.9% (1/15 M)，$Na_2HPO_4 12H_2O$ 2.39% (1/15 M).

(2)　**ゲル等電点焦点法** (図 1-2). この方法は pH の差によってパターンを比較しようとするもので従来の電気泳動法よりも試料が少なくてすみそのうえ鮮明な分離像が得られる。pH の勾配は分離ゲル中に“アンフォライン”(pH 3～10, LKB 社製) を入れ電流を流すことによって連続した pH 勾配を形成する。またこの方法は従来の電気泳動のときのように濃縮ゲル層は作らず分離ゲルの上に直接試料約 0.3 ml を入れる。それを電気泳動を行なうときと同じ装置にとりつけ，カラムの空間部および上部液槽に電極液 (+)，1.7 ml/l 塩酸を，下部液槽 (−) に，1.2 ml/l エチレンジアミンをそれぞれ満たす。このようにセットした装置を定電流定電圧装置にとりつけて 200V の定電圧で 3 時間流す。当初電流はカラム 1 本当たり約 4 mA であるが末期電流

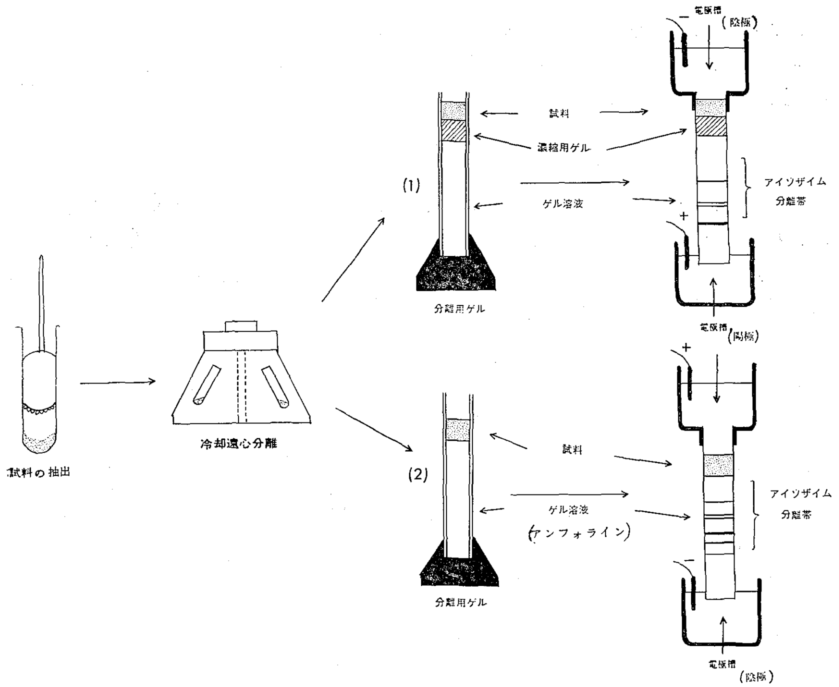

図 1. 電気泳動法とゲル等電点焦点法の方法.
(1)：電気泳動法，(2)：ゲル等電点焦点法.

は 0.25 mA である。(従来の電気泳動法は定電流を使用しているのに対しゲル等電点焦点法では電圧を一定にしている。これは電圧が 200 V 以上になるとアンフォラインの pH 勾配が阻害されるからである)。通電後ゲルをとり出しエステラーゼを検出して得られたザイモグラムについて，分離ゲルに現われるバンドの数，それらのバンドの pI 値（両性電解質が電気的に中性となる pH のこと），およびバンドの呈色濃度によって比較した。pI 値の測定は通電後染色前のゲルを 5mm の長さに等分して 5ml の水に 24 時間浸たした液について pH 値を測定して，染色したものとの比較によって推定した。

〜ゲル等電点焦点法に必要な試薬〜

1. 抽出溶液：トリス・グリシン (pH 8.3)—Tris 0.6%，グリシン 2.88%.

2. 電極液：陽極：塩酸 (d. 1.18) 0.17% (0.02 M)，陰極：エチレンジアミン 0.12% (0.018 M).

3. 分離用ゲル溶液：(A) アクリルアミド 30%，BIS 0.8%，TEMED 0.2%. (B) リボフラビン 40 mg/l. (C) アンフォライン (pH 3〜10) 8%.

(A) 2 : (B) 1 : (C) 1 : 水 4 (混合比)

4. ゲル染色用溶液： 従来の電気泳動の場合と同様に処理する。染色後のゲルは 7% 酢酸で冷暗所で貯蔵する。

結果および考察

供試した材料 14 種のうち ① スギナ (胞子), ② ヒメムカゴシダ (未熟胞子と葉を混合), ⑦ ジュウモンジシダ (未熟胞子と葉を混合), ⑨ オクマワラビ (未熟胞子と葉を混合), ⑭ ヤノネシダ (未熟胞子と葉を混合, 未熟胞子, 葉) の 5 種をホモゲナイズした場合, エステラーゼが検出された (図 2)。③ ホラシノブ, ④ ハマホラシノブ,

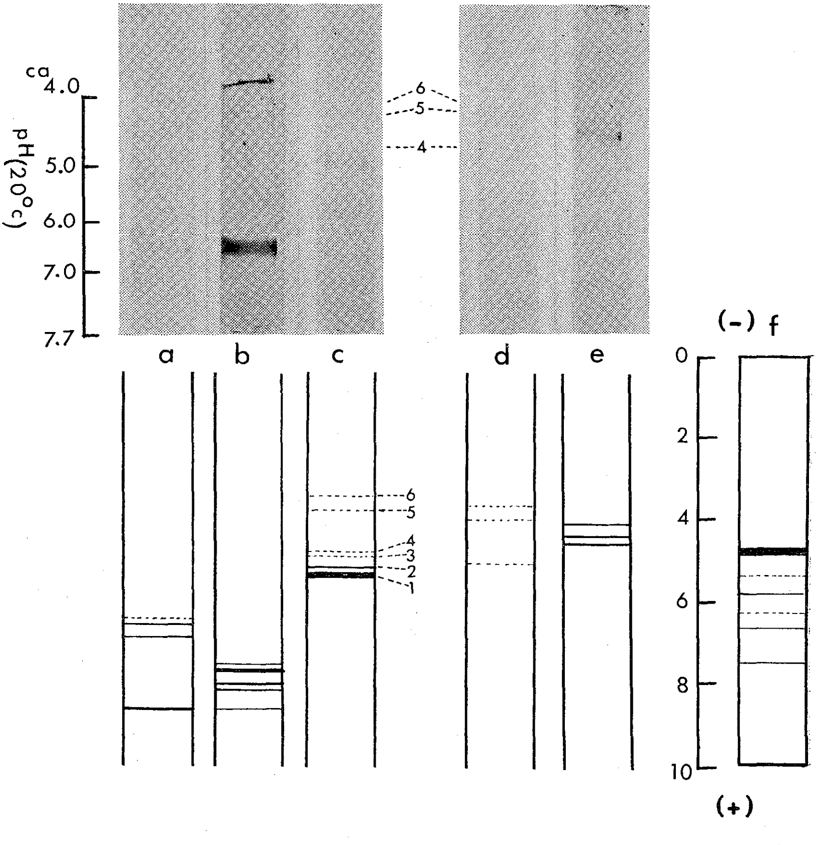

図 2. シダ類のエステラーゼザイモグラム. a. スギナ. b. ヒメムカゴシダ. c. ジュウモンジシダ. d. オクマワラビ. e. ヤノネシダ. f. ベニシダ.

⑤ イノモトソウ，⑥ オニイノデ，⑧ ヤブソテツ，⑩ クマワラビ，⑫ コモチシダ，⑬ アオネカズラでは胞子，葉ともに活性が非常に低いためか本実験の方法ではエステラーゼが現在検出されていない。酵素活性と発育の各段階との関係は植物によって多少の違いが見られるが麦類など種子蛋白の分析では吸水後約 80 時間ではほとんど変化がなく 120 時間以上たつと多少変化を示す。Siegel (1967) らはエンドウを用いて発育の段階および各器官とエステラーゼ活性を詳しく研究したがザイモグラムでのバンドの絶対数においては大きな変化がなくバンドの呈色濃度（活性の高低）において変化を示した。（茎がのびてゆく間にパターンの変化がおこり光を興えた緑色の茎では（+）側のあるバンドの活性が高くなる）。シダ植物においては発芽時（多年株からの発芽）ではエステラーゼ活性が全く見られず胞子形成期に比較的高い活性を示す。またそれぞれの品種において胞子のみを純粋に採取することがむつかしく，胞子のう，葉の片が混じることが考えられる。葉と胞子での酵素活性は本来，異なると考えられるが ⑭ ヤノネシダを使って実験した結果差が見られなかったことから本実験では未熟胞子と葉を混合してその抽出液からのパターンによって検討した。⑭ ヤノネシダを予備実験に用いたのは，冬期（1～2 月）が減数分裂期であり，また試料の抽出においても低温期であるため酵素活性が安定していると考えられるからである。

その結果 ① スギナ（2 図 a）では pI ca 5.0（分離ゲルの下方から 3.0 cm の位置）に 1 本の活性の非常に低いバンドと，これよりやや活性の高いバンドが 2 本（pI ca 5.1）認められ，さらに pI ca 7.4（下方から 1.5 cm の位置）にやや活性の高い 1 本のバンドが見られ，合せて 4 本のバンドをもつザイモグラムが示された。② ヒメムカゴシダ（2 図 b）では分離ゲルが他に比べてやや短かくなったために直接の比較はできないが pI ca 7.0 にあたると思われる 1 本のバンドはやや活性が低く pI ca 5.0 と考えられる 2 本のバンドの活性は非常に高かった。そのうえ ② ヒメムカゴシダではやや活性の低いバンドが 1 本ずつ活性の高いバンドとそれぞれ相対しているように認められた。

一方オシダ科に属する 2 種，⑦ ジュウモンジシダ（2 図 c），⑨ オクマワラビ（2 図 d）はともに型としてはよく似たザイモグラムを示したが基本的には大きく異なっていた。比較をわかりやすくするためにそれぞれのバンドに番号をつけた（⑦ ジュウモンジシダと ⑨ オクマワラビのバンドの対応関係は明確ではないが ⑦ ジュウモンジシダのバンド 4, 5, 6 は ⑨ オクマワラビのバンド 4, 5, 6 に対応しているものと考えている）。⑦ ジュウモンジシダでは活性の比較的高いバンド 1, 2（pI ca 5.3）と活性の非常に低いバンド 3, 4（pI ca 5.0），5, 6（pI ca 4.4）合せて 6 本のバンドを示した。⑨ オクマワラビは非常に活性が低かったが 3 本のバンドが認められた。バンド 4 は pI ca 5.0 に，バンド 5, 6 は pI ca 4.4 に見られるパターンである。⑨ オクマワラビでは ⑦ ジュウモンジシダで見られた 1, 2, 3 のバンドを欠いていた。⑭ ヤ

ノネシダ (2図 e) では胞子のみを用いた場合も成葉と胞子を混合したときでも活性にはほとんど変化なく pI ca 4.4～4.5 の位置に 3 本のバンドが認められ，このうち 2 本のバンド (pI ca 4.5) は比較的活性が高かった。葉のみを用いたときはパターン全体の活性が非常に低かった。

なお従来の電気泳動法とゲル等電点焦点法で現われるパターンについて比較してみるとゲル等電点焦点法で現われるバンドは非常に鮮明で分離能が高いことを示している。このためバンドの数は一般的には従来の電気泳動法に比べて多く識別される傾向がある。しかし本実験においてオシダ属の一系統，⑪ ベニシダ (京大・理・植物園産) は電気泳動法では特異なパターンを示した (2図 f)。だが，ゲル等電点焦点法で同じ材料を用いて行なった結果，エステラーゼは検出されず前述のパターンがこの系統特有のザイモグラムであるかは明確でない。⑪ ベニシダの Rf 値を調べてみると Rf 4.5 に非常に活性の高いバンドを示し Rf 5.5, 5.9, 6.2, 6.8, 7.5 に合せて 6 本のパターンを示している。

植物の種子や葉に含まれる酵素や蛋白質を分離してそれらの示すパターンが細胞遺伝学的な研究の結果明らかにされている系統関係とかなり一致することが Chu (1967), Johnson ら (1967) によって報告された。Chu はイネにおける種の分化とパーオキシダーゼアイソザイム・パターンの差異という観点から葉身あるいは葉鞘部位などのパーオキシダーゼを検討している。イネの栽培種にはアジアの *Oryza sativa* とアフリカの *O. glaberrima* の 2 種類があり，これらは *O. perennis* および *O. breviligulata* から進化してきたと考えられている。これらのパーオキシダーゼを電気泳動的に調べた結果アジアの *O. sativa* は 1 型 (原点から陽極側へ移動する活性帯，2A バンドのみをもつ)，または 2 型〔2A, 4C (陰極側へ移動する) バンドをもつ〕で日本米 (Japonica) は 1 型が，インド米 (Indica) は 2 型が多く見られた。一方 *O. perennis* (アジア，アフリカ) では 1 型，2 型だけではなく 4 型 (4C, 5C バンド), 6 型 (4A バンド)，7 型 (4A, 4C)，10 型 (2A, 3A, 4A, 4C) など多くの型がありアジアの *O. perennis* はアフリカの *O. perennis* にない 4A, 5C のバンドが少なくこの点 *O. sativa* と似ている。また *O. breviligulata* と *O. glaberrima* のパーオキシダーゼのアイソザイムは非常に単純な (2A4C, 2A4C6C, と 2A4C5C6C) バンドをもつ 3 種のパターンしかなくこれらの 2 系統は非常に似ていた。そしてそれぞれの集団内での変異も *O. breviligulata* では非常に小さく *O. perennis* では非常に大きいことを指摘している。また Johnson らはコムギにおいてゲノムの関係を蛋白質パターンから分析し細胞学的な研究とほとんど一致することを明らかにした。現在栽培されているパンコムギ (AABBDD) は二粒系コムギ (AABB) と近縁の雑草 (*Aegilops*) の一種，タルホコムギ (DD) からできたといわれているがパンコムギでは 12 本のバンドを示すのに対し二粒系では陰極側のバンド Rf 6.7, 9.3, 10.5 の 3 本のバ

ンドを欠きこれらのバンドがＤゲノムを持つタルホコムギから由来したものと考えた。Hart (1967) らもコムギをはじめ，タバコ (*Nicotiana*) の葉に含まれるいろんな酵素（パーオキシダーゼ，エステラーゼ，アミノペプチデース）から系統分化の関係を研究しそれぞれのアイソザイムのパターンから分化の過程を推定している。著者ら (1969) が酵素，蛋白質の新しい分離法であるゲル等電点焦点を用いてコムギ属種子のエステラーゼの分析を試みた結果，従来の電気泳動法では明確にされなかった鮮明な分離能を示しコムギ各系統内での変異をある程度特有のパターンとして示すことが明らかとなった。これまでの電気泳動法では二粒系コムギ (AABB) において大きな変異が見られなかったがゲル等電点焦点法ではかなりの変異があることが明らかとなり，野生型二粒系コムギと栽培型二粒系コムギでのエステラーゼ・パターンからこれら両系統の間にはかなりの遺伝的分化が見られる。それで，シダ植物を用いてコムギの場合と同じ方法で実験を行なったところ，シダ類に含まれるエステラーゼの活性が非常に低いため充分な結果が得られなかったが今まで実験されてきた植物に比べてシダ類には非常に多くの品種があり生態も種によって非常に異なることから試料を求めるにしてもすべて均一に行なうことは困難を伴う。またシダ類の胞子および葉の細胞はコムギなどに比べて破砕されにくいことや，あるいはシダ類のエステラーゼがコムギなどに含まれるエステラーゼと質的に異なっており，シダ類のエステラーゼ活性をおさえている何らかの物質が存在していることなどが推察される。シダ類においてもパターンと類縁関係については本実験でも各種の間でかなりの差が認められた。ゲル等電点焦点法をシダ類に用いる場合は特に活性が低いので材料の採取と抽出に注意せねばならないし抽出する酵素の種類も考慮する必要がある。この実験においてザイモグラムと系統関係についての詳細な論議は材料が少なく，明確にはいえないが科，属の違いによってパターンもかなり変化しているものと考えられる。

引用文献

1) Awdeh, Z.L., A.R. Williamson & B.A. Askonas 1968. Iso-electric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. Nature **219**: 66–67. 2) Chu, Y. 1967. Variations in peroxidase isozymes of *Oryza perennis* and *O. sativa*. Jap. J. Genet. **42**: 233–244. 3) Dale, G. & A.L. Latner 1968. Iso-electric focusing in polyacrylamide gel. Lancet **1**: 847–848. 4) Hart, G.E. & C.R. Bhatia 1967. Acrylamide gel electrophoresis of soluble leaf proteins and enzymes from *Nicotiana* species. Canad. J. Genet. Cytol. **9**: 367–374. 5) Johnson, B.L., D. Barnhart & O. Hall 1967. Analysis of genome and species relationships in the polyploid wheats by protein electrophoresis. Amer. J. Bot. **54**: 1029–1098. 6) Nakai, Y.,

T. Teramura & K. Tsunewaki 1969. Variation in esterase of *Triticum* and *Aegilops* analyzed by the gel isoelectrofocusing technique. Jap. J. Genet. **44**: 259–270. 7) Siegel, B.Z. & A.W. Galston 1967. The isoperoxidase of *Pisum sativum*. Plant physiology **42**: 221–226. 8) 田川基二 1959. 日本原色羊歯植物図鑑.

Summary

The acrylamide gel isoelectric focusing method was applied to the comparison of the esterase extracted from fronds and spores of some species of the Pteridophytes. The isozyme bands obtained by this method separate more clearely than those by the usual electrophoresis. The esterase patterns from six species out of fourteen show specific specialities. It is suggested that this method is useful for the chemotaxonomy of the Pteridophytes. Fig. 2. exhibits some examples of the esterase zymograms. a. *Equisetum arvense*. b. *Monachosorum arakii*. c. *Polystichum tripteron*. d. *Dryopteris uniformis*. e. *Neocheiropteris subhastata*. f. *Dryopteris erythrosora*.

○ヤマアイにはアイを含まない（久内清孝） Kiyotaka HISAUCHI: Indigo is not found in Japanese Dog's Mercury.

トウダイグサ科のヤマアイ *Mercurialis leiocarpa* Sieb. et Zucc. は，古来アイを含有するものとされて有名なものだが，これにアイが含まれているというのは，どうやらあやしい。いろいろな文献には，アイを含むとかいてはあるが，アイといわれている青い色は別のものと思われる。平尾子之吉氏の日本植物成分総覧（上 446）には，セイヨウヤマアイ（*M. annua* L.）には hermidin なる色素はあるが，インジゴーは存在せずとかいてあるけれども邦産のものにはふれていない。平尾氏は，おそらく，C. Wehmer の Die Pflanzenstoffe (1929) にでもよられたものかと思われるが，しかし日本のものについても，同様に考えられるので，念のため友人の化学者に実験してもらったら，全く含まれていないことが判った。既に権威ある書物にアイが含有されているようにかいてあるのでここに記して示教をまつことにした。

○中国産玄参に和名を与える（久内清孝） Kiyotaka HISAUCHI: A new Japanese name for *Scrophularia ningpoensis*.

往年中国から玄参の名で手にいれた種子が発芽生長して花をつけた。これは *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. に該当するもので，あちらでは元参，黒参などの別名でよばれる。ゴマノハグサ（中国では北玄参）に玄参をあててきた我々の旧知識は改めるべきだろう。我が国のオオヒナノウスツボに似た草である。日本の土に生えたのだから山崎敬氏と談合の上中国名を音よみにしてゲンジンの名を和名として提出する。